

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE - N° 165

Travail du Laboratoire de Matière Médicale et Botanique
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

Contribution à l'étude
des
PHYTOSTÉROLS VÉGÉTAUX

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 10 Juillet 1931

PAR

Robert BIGÉ

Né le 26 Novembre 1905 à TAINGY (Yonne)



LYON

BOSC Frères, M. et L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

1931

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DES PHYTOSTÉROLS VÉGÉTAUX**

UNIVERSITÉ DE LYON

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE - N° 165

Travail du Laboratoire de Matière Médicale et Botanique
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon

Contribution à l'étude
des
PHYTOSTÉROLS VÉGÉTAUX

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

SECTION DE PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement devant la Faculté de Médecine et de Pharmacie

Le 10 Juillet 1931

PAR

Robert BIGÉ

Né le 26 Novembre 1905 à TAINGY (Yonne)



LYON

BOSC Frères, M. et L. RIOU

IMPRIMEURS-ÉDITEURS

1931

PERSONNEL DE LA FACULTÉ

Doyen honoraire	M. L. HUGOUNENQ
Doyen	M. J. LEPINE
Assesseur	M. ROLLET

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. CAZENEUVE, ROQUE, LANNOIS, HUGOUNENQ, ROCHET, BARRAL.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	}	MM. PIC
Cliniques chirurgicales	}	PAVIOU
Clinique obstétricale et Accouchements		TIXIER
Clinique ophtalmologique		BERARD
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques		VORON
Clinique neurologique et psychiatrique		ROLLET
Clinique des maladies des enfants		NICOLAS
Clinique des maladies des femmes		LEPINE (J.)
Clinique d'oto-rhino-laryngologie		MOURIQUAND
Clinique des maladies des voies urinaires		VILLARD
Clinique chirurgicale, infantile et orthopédie		COLLET
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie		GAYET
Chimie biologique et médicale		NOVE-JOSSERAND
Chimie organique et Toxicologie		CLUZET
Matière médicale et Botanique		FLORENCE
Parasitologie et Histoire naturelle médicale		MOREL
Anatomie		X.
Histologie		GUIART.
Physiologie		LATARJET
Pathologie externe		POLICARD
Pathologie interne		DOYON
Pathologie et Thérapeutique générales		VALLAS
Anatomie pathologique		FROMENT
Chirurgie opératoire		CADE
Médecine expérimentale et comparée et bactériologie		FAVRE
Médecine légale		PATEL
Hygiène		ARLOING (F.)
Thérapeutique		Etienne MARTIN
Pharmacie et Pharmacologie		COURMONT (P.)
Hydrologie thérapeutique et climatologie		SAVY
		LEULIER
		PIERY

PROFESSEUR TITULAIRE SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Propédeutique de gynécologie	CONDAMIN
---	----------

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

Anatomie topographique	MM.	THEVENOT (Léon)
Puériculture et hygiène de la première enfance		RHENTER
Chirurgie expérimentale		TAVERNIER
Applications du radium		NOGIER
Stomatologie		TELLIER

AGREGES

MM. NOGIER ROCHAIX RHENTER MAZEL SANTY CHALIER (André)	MM. CHALIER (Joseph) NOEL DUMAS DUFOURT DEVIC GABRIELLE MANCEAU	MM. MARTIN (Joseph) ROCHET (Ph.) WERTHEIMER GATE BERNHEIM DECHAUME POLLOSSON	MM. CHAMBON CIBERT EPARVIER GUILLEMINET MORENAS ROCHE REBATTU ch.
--	--	---	--

M. BAYLE, Secrétaire.

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

MM. LEULIER, président ; MOREL., assesseur :

MANCEAU et CHAMBON, agrégés.

La Faculté de médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.



A LA MÉMOIRE DE MA SŒUR DENISE

A MON PÈRE, A MA MÈRE

Qu'ils reçoivent l'hommage de ce
modeste travail comme un bien faible
témoignage de ma tendresse et de ma
reconnaissance infinie.

A MA FIANCÉE

A LA MÉMOIRE DE MONSIEUR LE PROFESSEUR BRETIN

Dès notre arrivée à Lyon, il témoigna envers nous d'une très grande affabilité et durant ce travail entrepris sous sa bienveillante direction, il ne nous ménagea ni ses conseils, ni ses encouragements.

Nos regrets sont accrus par l'impuissance où nous sommes maintenant de lui témoigner nos sentiments de bien vive gratitude.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR LEULIER

*Professeur de Pharmacie et Pharmacologie
Chevalier de la Légion d'Honneur*

A MES JUGES

MONSIEUR LE PROFESSEUR MOREL

*Professeur de Chimie organique et de Toxicologie
Chevalier de la Légion d'Honneur*

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ MANCEAU

~~*Professeur de Pharmacie et Histoire Naturelle*~~
Chevalier de la Légion d'Honneur

MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ CHAMBON

Professeur de Chimie minérale

Avant-propos

Nous voulons en terminant ce travail, rappeler à notre souvenir et à notre reconnaissance tous les Maîtres qui nous ont guidé dans nos études chimiques et pharmaceutiques.

C'est pour nous un agréable devoir de rendre hommage à M. BOURGEON, docteur en pharmacie, qui nous initia à notre profession, il y a huit ans, avec tant de dévouement et de haute conscience.

A MM. les Professeurs VOISENET et BOUTARIC, de l'Université de Dijon, dont les savantes leçons et la constante amabilité nous rendirent attrayants les débuts d'une science difficile, nous tenons à affirmer ici une fois de plus tout notre attachement.

A M. le Professeur agrégé MANCEAU, nous voulons témoigner tout particulièrement nos sentiments de reconnaissance. Avec la plus grande bienveillance, il a mis à notre disposition son laboratoire et ce qui est plus encore, les ressources de sa grande compétence scientifique.

Nous remercions très vivement MM. les Professeurs MOREL, LEULIER et CHAMBON, qui se sont intéressés à ce travail et ont accepté de l'examiner.

R. B.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DES PHYTOSTÉROLS VÉGÉTAUX

Introduction

CONRADI en 1775 découvre la cholestérine dans les calculs biliaires. BERTHELOT (4) (1859) établit sa nature monoalcoolique et lui donne la formule $C^{26}H^{44}O$ déjà proposée par GERHARDT (16).

Sa composition chimique avait été déterminée quelques années auparavant par CHEVREUL (1855) (7).

Ce corps nouveau est aussitôt découvert dans tous les tissus animaux, et, chose curieuse, toujours identique à lui-même, tout au moins au point de vue chimique, quels que soient l'animal et l'organe étudiés.

Aussi, lorsqu'en 1862 BENEKE découvre dans les pois et l'huile d'olive un corps de composition et de propriétés physiques et chimiques très voisines, présentant les mêmes réactions colorées que le produit animal, il les identifie aussitôt. RITHAUSEN l'imite avec le produit qu'il retire du gluten par l'éther. Il faut attendre 1878 pour que HESSE, retrouvant la même substance dans la fève de Calabar, l'étudie et montre que par son point de fusion, son pouvoir rotatoire et sa composition centésimale, ce produit diffère

absolument de la cholestérine animale. Ce corps nouveau, il l'appelle phytostérine.

D'autres corps analogues mais différant toujours les uns des autres par quelque caractère physique ou chimique furent successivement découverts en :

1887 par LIPPMAN dans l'écume des jus de *betteraves*;

1882 par SCHULZE et BARBIERI dans les germes de *Lupin*; REINKE et RODEWALD, dans l'*Aethalium septicum* ;

1889 par JACOBSON dans les *Fèves des marais*, les pois, le lupin ; TANRET dans l'*ergot de Seigle* (ergostérol); DUNSTON et CHASTON dans la *Scopolie* ;

1907 par KLOBB et BLOCH dans les graines de *Soja* (sojastérine), etc., etc.

Actuellement, on peut dire que partout où les stérols ont été recherchés, on a pu les signaler en quantité très faible souvent, mais toujours d'une façon probante, et ceci, quels que soient la famille, le végétal et l'organe étudiés.

Extraits de la partie dite *insaponifiable* des huiles, ils donnent avec les acides gras des éthers analogues aux graisses neutres.

BANG s'appuyait sur ce fait pour les classer parmi les lipoïdes. ABDERHALDEN en a fait une famille spéciale, celle des stérines, ou mieux des stérols pour se conformer à la nouvelle nomenclature. WINDAUS les définit : « corps chimiques naturels parmi lesquels la cholestérine est la plus connue, alcools à poids moléculaire élevé, riches en hydrogène, non saturés, insolubles dans l'eau ».

Leur étude a été compliquée : 1° par leurs relations

assez mal établies avec d'autres principes immédiats; 2° par la difficulté à différencier des alcools dont la formule ne diffère que par C ou H² en plus ou en moins.

TANRET et GÉRARD (1895) (14) ont montré que les corps fournis par les Cryptogames diffèrent essentiellement de ceux retirés des Phanérogames. Actuellement, les chimistes admettent la pluralité des stérols végétaux, et l'unicité du produit animal, bien que certains travaux en cours admettent une certaine différence physique en particulier dans les spectres d'absorption donnés par les stérols animaux.

Sur l'importance physiologique de ces corps, nous ne pouvons donner de meilleure opinion que celle de BENEKE (18) : « La cholestérine doit se trouver partout où les phénomènes de la vie et le développement des formes organiques atteignent leur plus grand développement ».

Division de notre travail

Première partie : Les Phytostérols (Propriétés physiques et chimiques. Classification. Réactions colorées. Relations avec les autres principes immédiats. Extraction. Méthodes de dosage. Origine botanique et rôle).

Deuxième partie : Premiers travaux : étude des variations des quantités de stérols contenues dans tous organes du blé, de la pomme de terre et du pois. Causes de notre échec.

Troisième partie : Nouveaux travaux (objet de notre thèse) : étude des quantités relatives de Phytostérols contenues dans les téguments et l'amande, dans la partie interne et la partie corticale de différents fruits, graines, tubercules et bulbes.

PREMIÈRE PARTIE

Propriétés physiques des phytostérols

Les phytostérols cristallisent en lamelles hydratées dans l'alcool et en aiguilles soyeuses dans l'éther. Parfois, les cristaux ne sont pas définis (stigmastérol).

Le point de fusion varie avec le temps, le mode de détermination et le degré de pureté. C'est ainsi que l'ergostérol fond à 165° (TANRET) (36) au bloc Maquenne et 4° plus bas dans le tube effilé, sauf si le tube est rempli de gaz carbonique.

La variation peut être rapide par formation d'un isomère peu stable (KLOBB et BLOCH) ou lente et progressive (sitostérol).

Chaque stérol possède un pouvoir rotatoire différent comme grandeur et comme signe. Certains éthers ont une déviation plus grande que les alcools correspondants (acétates de sojastérol et d'arnidiol). Celle de l'ergostérol diminue avec le temps.

Les phytostérols sont solubles dans tous les solvants organiques usuels. Ils donnent avec l'eau des pseudosolutions d'où ils précipitent par addition d'électrolytes. Le charbon activé par les rayons ultra-violets les enlève de leurs solutions alcooliques.

Propriétés chimiques des phytostérols

La constitution chimique des phytostérols est extrêmement pénible à établir. Ce sont des corps très résistants et difficiles à fractionner. L'analyse élémentaire montre qu'il existe des corps en C^{27} , C^{22} , C^{30} , la proportion de C à H étant elle-même variable, les formules différant par H^2 en plus ou en moins. D'autre part, chaque végétal contient rarement un seul stérol et RITTER en 1901 présume que les corps étudiés « sont des mélanges de deux phytostérols différents et que les propriétés varient parce qu'ils renferment les deux composants en proportion variable ».

L'étude de leur formule développée a fait l'objet des travaux de DIELS et ABDERHALDEN, WINDAUS et STEIN, CUNY, WISLICENUS et MOLDENHAUER. La question n'est pas encore résolue d'une façon certaine et les points suivants seuls offrent un intérêt particulier (1) :

1° Présence d'un atome d'oxygène faisant partie d'un oxhydrile alcoolique;

2° La présence de doubles liaisons;

(1) Nous nous sommes inspirés, pour la rédaction d'une partie de ce chapitre, du travail récent de REVOL (29).

3° La structure moléculaire prise dans son ensemble.

Ces corps donnent des cétones par oxydation brutale, précipitent de leurs solutions alcooliques en donnant des complexes avec la gitonine, la dioscine, la digitonine, l'uréthane (ABDERHALDEN), s'oxydent à l'air et à la lumière en donnant un produit jaunâtre, dont le pouvoir rotatoire et le point de fusion vont en s'abaissant (expérience de SCHULZE et WINTERSTEIN sur l'ergostérol). Leurs acétates absorbent le brome, ce qui permet à WINDAUS de les classer en deux grandes familles suivant qu'ils possèdent une ou deux doubles liaisons, les derniers ayant un pouvoir rotatoire et un point de fusion plus élevés.

Les phytostérols connus ont tous une et rarement deux fonctions alcool se laissant étherifier *in vivo* par les acides gras végétaux et *in vitro* par de nombreux acides organiques.

Classification des phytostérols

Les formules développées et les propriétés physiques et chimiques de beaucoup de ces corps étant mal connues ne peuvent servir de base à une classification rationnelle. L'origine botanique est également impropre le même stérol pouvant exister dans plusieurs familles tel le sistostérol trouvé chez les *Craminées* et dans la *fève de Calabar* qui est une Légumineuse.

Seul le pouvoir rotatoire permet d'établir des différences tranchées. C'est sur lui KLOBB (18) a basé sa classification, dont voici les grandes lignes :

Phytostérols lévogyres de C^{25} à C^{30} , contenus dans la fève de Calabar, les graines de Lupin, les haricots, les pois, le blé, les huiles de coton, d'œillette, d'arachide, etc. La déviation varie de -20° pour le stérol du *coton* à $-36^{\circ}4$ pour celui du *Lupin*. Le plus répandu est le sitostérol $C^{27} H^{44}O$ ou $C^{27} H^{46}O$.

De ce groupe font partie également les stérols des cryptogames dont la déviation quatre ou cinq fois plus grande varie de -22° à -126° .

Homologues inférieurs gauches : moins riches en carbone que les précédents mais plus riches en hydrogène, donnent difficilement des dérivés monobromés,

espèces chimiques bien définies. Citons le Cinchol, le Cupréol, le Québrachol (*Québracho*), les stérols du *Ko-Sam*, de l'écorce de *Cascara*, du beurre de *muscade*, tous en $C^{20} H^{34} O$, le cholestol en $C^{22} H^{38} O$.

Phytostérols univalents dextrogyres : surtout répandus dans les caoutchoucs, les résines et les guttas tel l'amyrol $C^{30} H^{50} O$ de la *résine élémi de Manille*, étudiée par VERSTERBERG, retrouvé par COHEN dans le caoutchouc d'*Euphorbè* et par TSCHIRCH dans d'autres *élémis*. Il existe aussi dans la *résine antiar*, le *balata de Surinam*. Dans le même groupe est le Lupéol de déviation $+27^\circ$ retiré par SCHULZE du *Lupin blanc*, par JUNGFEICH et LEROUX de la gutta des feuilles du *Palaquium Treubi*.

Phytostérols inactifs : $C^{26} H^{44} O$ de la racine de betterave (RUMPLER) de la *résine élémi*, du *protium carana*.

Phytostérols bivalents : donnent les réactions colorées avec de légères différences (Réaction de Liebermann rouge vineuse avec fluorescence verte), sont dextrogyres et présentent un point de fusion très élevé. THOMS a étudié l'Onocol $C^{26} H^{44} O^2$ de la racine d'*Ononis Spinosa*, KLOBB l'arnidiol de l'*Arnica* et le faradiol $C^{30} H^{50} O^2$ du *Tussilago farfara*. Il définit ces corps comme étant au sitostérol ce que le glycol est à l'alcool ordinaire.

Pseudo-phytostérols : ne donnent pas les réactions caractéristiques et sont insolubles dans l'alcool : pal-treubine de la gutta de *Palaquium* et bréine de l'*élémi*.

Réactions colorées

Les phytostérols présentent la plupart des réactions colorées de la cholestérine animale, mais des différences apparaissent dans le mode opératoire, en particulier dans la quantité de réactifs à employer, dans la vitesse d'apparition de la couleur et dans sa nuance. Ces différences permettent de distinguer entre eux tous les corps englobés sous le vocable stérols et ceux qui s'y rattachent plus ou moins, tels que les terpènes. Les réactions de KLOBB permettent de séparer les alcools gauches des droits. D'autres réactions colorées mettent en évidence les différences et les analogies de ces corps d'origines diverses: le stérol animal, les stérols des Phairérogames et ceux des Cryptogames.

I. — Réactions utilisant l'acide sulfurique

Citons :

1° RÉACTION DE DENIGES (25)

A une solution chloroformique on ajoute un demi-volume d'acide sulfurique, puis on additionne la couche chloroformique supérieure de quelques gout-

tes d'anhydride acétique, elle prend une belle coloration rouge, tandis que l'acide sulfurique (couche inférieure) devient violet.

2° RÉACTION DE HEINTZ (25)

On évapore la solution sur lame et on ajoute un peu d'acide sulfurique additionné de $1/5^e$ de son volume d'eau ; les cristaux se colorent en rouge carmin, puis en violet.

Si on ajoute un mélange du même acide sulfurique et d'un peu d'eau iodée, ces cristaux du violet passent au bleu, au vert, puis au rouge.

3° RÉACTION DE HESSE

Si à la solution chloroformique on ajoute de l'acide sulfurique à 1,76, le chloroforme et l'acide se colorent avec production d'une fluorescence jaune ou verte suivant la nature de l'alcool.

4° RÉACTION DE NEUBERG (25)

La cholestérine en solution alcoolique additionnée d'un peu de rhamnose ou de méthylfurfurol en solution aqueuse est versée au-dessus d'acide sulfurique concentré : Il y a production d'un anneau rouge framboise à la surface de séparation. Si on agite en refroidissant tout le liquide se colore en rouge.

5° RÉACTIONS DE G. S. WHITBY (41)

a) A 2 cm³ d'une solution chloroformique de stérols on ajoute 2 cm³ du réactif obtenu en mélangeant de l'acide sulfurique concentré et du formol dans la

proportion de cinquante pour un ; après agitation et repos, la couche supérieure chloroformique est rouge cerise, tandis que l'inférieure sulfurique est brun rouge avec fluorescence verte intense.

Si on décante la couche supérieure dans un tube sec et qu'on ajoute 2 gouttes d'anhydride acétique, il se forme une belle coloration bleue éclatante qui devient lentement verte.

Cette réaction serait plus sensible que celle de SAL-KOWSKI.

b) A 2 cm³ d'une solution de cholestérine dans l'acide acétique glacial, on ajoute en agitant 25 gouttes du réactif : acide sulfurique et formol ; il y a production d'une coloration rose avec fluorescence.

Cette réaction est plus sensible que celle de LIBERMANN, mais n'est pas quantitative.

c) Sur porcelaine, on chauffe doucement la cholestérine additionnée d'anhydride acétique jusqu'à fusion et évaporation de l'excès d'anhydride. Après refroidissement, on humecte avec de l'acide azotique concentré ; il se produit une coloration bleue ou bleue verte se développant en quelques secondes.

Cette réaction, très fidèle pour la cholestérine, l'est moins pour les phytostérols.

6° RÉACTIONS DE KLOBB (18)

Donnent des colorations variables avec le signe de la rotation polarimétrique. Le réactif employé est l'acide sulfurique nitreux. On étale le liquide au contact de l'air dans une petite capsule, et le maximum de coloration se produit au bout d'une heure.

a) Les phytostérols gauches (*tilleul-soja-lupin-lus-silage*) et la cholestérine animale se colorent en rouge brique clair ou saumon au contact du réactif, plus tard le liquide passe au brun rouge foncé ou au rouge vineux.

b) Les alcools droits (anhestérol-amyrol-lupéol) donnent une coloration rouge pourpre intense.

7° RÉACTIONS DE GÉRARD (15)

Nous l'avons vu plus haut, l'auteur ainsi que TANNERET, différencie nettement les stérols des Cryptogames de ceux des Phanérogames, et il a mis au point un certain nombre de réactions différentielles. Il est intéressant de remarquer que, dans chaque cas, le produit animal donne le même précipité et la même couleur que le produit retiré des végétaux supérieurs.

RÉACTIF	PHYSTOSTÉROLS ET CHOLESTÉROL	ERGOSTÉROL
Acide sulfurique concentré	Coloration jaunâtre. Précipité blanc avec l'eau.	Coloration rouge précipité vert avec l'eau.
Solution dans: Tétrachlorure de carbone plus acide sulfurique de densité 1,76	Coloration jaune claire. Précipité blanc laiteux avec l'eau. Le tétrachlorure reste incolore.	Coloration rouge sang. Le tétrachlorure devient vert par repos.
Solution dans: Chloroforme plus anhydride benzoïque plus acide sulfurique	Coloration jaune citron puis rouge. Chloroforme est rouge sang puis violet. L'acide est brun avec fluorescence verte très intense.	Coloration rouge sang. Le chloroforme est jaune brun puis incolore. L'acide est brun avec fluorescence verte très légère.

8° AUTRES RÉACTIONS AVEC L'ACIDE SULFURIQUE (36)

La réaction est différente suivant qu'on opère dans le verre ou dans la porcelaine et varie avec la quantité d'acide et le stérol étudié.

a) Dans le verre, avec l'acide à 96 % :

La cholestérine se dissout incomplètement en donnant une coloration jaune qui passe au brun jaunâtre. Par addition de chloroforme, celui-ci se colore en jaune puis en brun jaunâtre et finalement en rouge foncé violet, tandis que la couche inférieure acide est jaune brun.

Avec des acides moins concentrés, le chloroforme prend plus rapidement la coloration rouge. L'acide à 82 % est sans action.

Les phytostérols donnent une coloration plus faible. L'ergostérine et la fongistérine se dissolvent entièrement avec l'acide à 96 % en donnant une coloration rouge orangé. Par addition de chloroforme, celui-ci reste incolore.

Avec les acides moins concentrés, la coloration rouge violet prise par le chloroforme est maxima avec l'acide à 86 %, puis s'affaiblit jusqu'à 82 %. La couche inférieure sulfurique est brun rouge ou rouge avec les acides de 92 à 100 % et violette avec les acides moins concentrés lorsqu'on les fait agir sur la fongistérine. L'ergostérine ne donne jamais cette coloration violette.

b) Dans la porcelaine :

La cholestérine additionnée de 10 gouttes d'acide sulfurique à 92 % ne se dissout pas, mais prend une

coloration rouge. Si on ajoute du chloroforme, il dissout la cholestérine en donnant une solution rouge.

La phytostérine donne une couleur brun noirâtre et l'acide prend une légère teinte brune. Le chloroforme ajouté prend une teinte bleue sale.

La tongistéline se colore en quelques secondes en rouge rubis avec l'acide à 90 %. Cette couleur vire au rouge violet en quelques minutes. L'acide ne dissout qu'une partie de la substance en prenant une coloration rouge violet.

Quant à la partie insoluble dans l'acide elle bleuit et donne avec le chloroforme une solution bleue.

L'ergostérine fraîchement préparée ou conservée à l'abri de l'air donne en plus d'une minute une couleur rouge sale avec dissolution partielle. Le chloroforme ajouté se colore à peine.

Un échantillon ancien d'ergostérine sera altéré par l'oxygène de l'air et donnera immédiatement une coloration rouge brun. Le chloroforme qu'on y ajoutera se colorera en vert.

9° RÉACTION DE SALKOWSKI (25)

Un mélange à parties égales d'une solution chloroformique de cholestérine et d'acide sulfurique concentré donne une couche supérieure (chloroforme) rouge sang, puis pourpre, bleue, verte et enfin jaune et une couche inférieure (acide) présentant une fluorescence verte. Par addition d'acide acétique cristallisable, la solution se colore en rose ; puis en pourpre, en montrant la même fluorescence verte.

10° RÉACTION DE LIEBERMANN (36)

Si à une solution chloroformique de cholestérol on ajoute quelques centimètres cubes d'anhydride acétique et quelques gouttes d'acide sulfurique, il se développe une coloration rose fugace remplacée par une belle couleur bleue passant au vert pré.

Ceci est vrai aussi pour les phytostérines et la fongistérine. La couleur bleue persiste plus de deux minutes et le vert pur est atteint en quatre minutes.

Avec l'ergostérine et ses éthers, le vert intense est atteint en vingt secondes. La cholestérine animale et ses éthers donnent le maximum de coloration en trente minutes.

Cette réaction, une des plus connues et la plus employée, donne des résultats variables avec le mode opératoire.

Les quantités de substance et d'acide sulfurique influent sur l'intensité de la coloration. La chaleur augmente la vitesse de réaction. Si le stérol est en très faible quantité, on atteint le vert directement sans passer par le rose pourpre.

Il est nécessaire d'employer un excès d'anhydride acétique et de respecter soigneusement les proportions des réactifs dans les dosages par colorimétrie.

11° RÉACTION DE COQUELET (9)

A 0 cm³ 5 d'une solution alcoolique de cholestérine on ajoute 0 cm³ 1 d'une solution alcoolique de furfurole, puis on fait couler le long des parois du tube

0 cm³ 5 d'acide sulfurique concentré en ayant soin d'éviter tout mélange. Par agitation brusque, il se produit une coloration rose qui passe au bleu.

II. — Réactions utilisant l'acide azotique

12° RÉACTIONS DE SCHULZE (19)

a) Si on mouille la cholestérine d'une goutte d'acide azotique, il y a production d'une coloration jaune qui passe au rouge jaunâtre par addition d'ammoniaque.

b) Si on ajoute de la cholestérine au mélange d'acide chlorhydrique concentré (trois volumes) et de perchlorure de fer à 10 % (un volume), il se produit une coloration rouge violacé qui passe au bleu par évaporation à sec.

Le camphre et l'essence de térébenthine donnent la même réaction .

13° RÉACTION DE L'ACIDE AZOTIQUE FUMANT (36)

Avec le cholestérol et le phytostérol retiré de l'*Asclepias Vincetoxicum*, il y a solution partielle avec légère coloration jaune et dégagement lent de vapeurs nitreuses une heure après.

Avec l'ergostérine il y a dissolution immédiate en donnant une liqueur brun rouge foncé avec dégagement de vapeurs nitreuses.

14° RÉACTION DE MONTIGNIE

Par action des vapeurs nitreuses sur une solution de cholestérine dans l'éther, on obtient une coloration jaune qui passe au vert.

III. — Réactions n'utilisant ni l'acide sulfurique ni l'acide azotique

15° RÉACTION D'OVERMÜLLER (25)

Le produit bien sec est chauffé une demi-heure au bain-marie bouillant sur une capsule avec quelques gouttes d'anhydride propionique, dans un tube à essai. Après refroidissement, on additionne d'alcool et on place un peu du précipité obtenu sur un agitateur de verre que l'on chauffe, puis on place à l'abri de la lumière.

Pendant le refroidissement, on voit la pâte devenir violette puis passer au bleu, au vert, à l'orangé, au rouge carmin, et finalement au rouge cuivre.

16° RÉACTION DE TSCHUGAEFF (25)

Production d'une coloration rose avec fluorescence verte et qui va augmentant d'intensité si on chauffe cinq minutes à l'ébullition, en chauffant avec de l'acide acétique cristallisable et additionné de chlorure d'acétyle et de chlorure de zinc. Cette réaction est plus sensible encore que celle de LIBERMANN.

17° RÉACTION DE HIRSCHSOHN

Production d'une couleur violette en chauffant le cholestérol avec un mélange d'acide trichloracétique et d'acide chlorhydrique.

18° RÉACTION DE STEINLE ET KAHLENBERG (34)

En traitant une solution chloroformique de cholestérol par le réactif obtenu en mélangeant 20 cm³ de pentachlorure d'antimoine avec la quantité suffisante de chloroforme pour avoir 100 cm³ de solution, on obtient un précipité brun foncé amorphe en présence d'un excès de réactif.

Ce précipité se dissout lentement dans le chloroforme et la solution diluée fortement se fait en passant du brun au rouge brun, magenta, pourpre et bleu cobalt intense, même à de très grandes dilutions.

La formation du précipité brun est indispensable pour obtenir la solution bleue. La réaction complète demande au moins cinq minutes. La présence de chlore libre dans le réactif empêche la réaction et on obtient dans ce cas une coloration brun rouge sans teinte bleue ultérieure.

Les auteurs ont observé que la coloration est encore sensible avec 0 gr. 000125 de cholestérine. L'intensité est proportionnelle à la quantité de substance mise en jeu.

Le précipité est soluble dans le chloroforme, l'alcool, mais peu dans le tétrachlorure de carbone. Les phytostérols dans les mêmes conditions donnent une réaction analogue, mais la coloration bleue apparaît moins vite, et la solution se maintient dans le violet pourpre plus longtemps. Avec ces stérols, la réaction n'est complète qu'au bout de quinze minutes.

Des quantités égales de phytostérols et de cholestérine donnent des colorations d'égale intensité sans

différence au spectroscope, car aucune ne présente de bandes d'absorption.

Les éthers du cholestérol et de l'isocholestérol donnent la même coloration.

Les auteurs ont encore fait les remarques suivantes :

a) Si l'on substitue d'autres chlorures au pentachlorure d'antimoine, on constate que les uns sont sans action tandis que les autres donnent des teintes variées non caractéristiques.

b) Le chloroforme est le solvant spécifique. Le tétrachlorure de carbone donne aussi le précipité brun mais la solution obtenue est rose saumon.

L'alcool ne donne pas la réaction, mais une coloration vert clair avec le précipité.

Les autres solvants : éther anhydre, anhydride acétique, acétone, benzine, toluène, donnent des réactions plus ou moins violentes et des couleurs diverses, mais ne présentant aucun intérêt.

c) Si l'on remplace les stérols par le bornéol, le pinène, le limonène, le terpinéol, le camphre, la thuyone, l'isoprène, le cinéol, l'anéthol, l'acide abiétique, on obtient la même coloration.

Par contre, le thymol, le carvacrol, le menthol donnent une coloration pourpre, tandis que le cédro!, le gaïacol, l'eugénol et le linalol donnent une coloration violet bleuâtre.

Fait intéressant, les acides biliaires ne donnent rien, les lipoïdes non plus, par contre les acides gras non saturés donnent une coloration dont l'intensité est di-

rectement proportionnelle à leur hauteur dans l'échelle.

19° RÉACTION DE SCHIFF (36)

On évapore presque à siccité à une douce chaleur dans une capsule, une petite quantité de cholestérine avec du perchlorure de fer, un peu d'acide chlorhydrique et de chloroforme : la masse prend une coloration violet rouge.

Après refroidissement, on ajoute de nouveau du chloroforme et on chauffe. Après évaporation, la masse prend une teinte violette qui passe au bleu puis au vert pâle.

20° RÉACTIONS DE MEESSEMAEKER (23) (20)

a) L'addition d'anhydride acétique, puis de chlorure de zinc à une solution chloroformique d'ergostérol, provoque l'apparition d'une coloration rose virant au vert. Cette réaction serait caractéristique des stérols des Cryptogames.

b) L'ergostérol, en solution chloroformique, vire au rose par le chlorure de zinc, lorsqu'il a été conservé dans l'obscurité. Conservé à la lumière ou irradié, il donne une coloration verte.

Relations avec les autres principes immédiats

I. — Relations avec les vitamines

RANDOUIN et SIMONNET (28) définissent les vitamines « substances encore indéterminées chimiquement et physiquement dont l'organisme animal serait incapable de faire la synthèse et qui possèderaient les propriétés reconnues de certaines fractions de l'indéterminé alimentaire, fractions qui, à des doses minimales de l'ordre du millièmo du poids de la ration quotidienne, sont indispensables à l'accomplissement des phénomènes vitaux au cours de la vie de l'animal, et dont l'absence détermine des troubles caractéristiques de la nutrition ».

Ces troubles par avitaminose ou par carence ont été depuis longtemps observés, et l'on savait les guérir par absorption de substances alimentaires dites riches en vitamines. Celles du type A se trouvent surtout dans les aliments riches en stérines (CHEVALIER) (6). Depuis longtemps, l'huile de foie de morue est employée pour combattre le rachitisme ; son action tiendrait à sa forte teneur en vitamine A liposoluble, et

ROSENHEIM (31) considère comme caractéristique de ce principe, la coloration bleue donnée par l'huile avec le trichlorure d'arsenic.

HÉSS, MC. CANN et PEPENHEIMER ont montré que la destruction de la vitamine A de l'huile de foie de morue par oxydation n'abolissait pas son pouvoir antirachitique dû à la présence constatée par eux de la vitamine D (cité par LEULIER) (20).

Le stérol de l'huile de foie de morue est actif naturellement (20) et perd son pouvoir par irradiation à l'ultra-violet.

Le facteur antirachitique est localisé dans l'insaponifiable. La cholestérine ne possède aucune action lorsqu'elle vient d'être extraite des tissus, et c'est par action des rayons ultra-violets qu'elle acquiert ces propriétés. On opère sur une solution à 2 % dans l'éther de pétrole dans une atmosphère d'azote à basse température (FABRE et SIMONNET) (13).

L'huile de lin dépourvue de vitamines devient active après irradiation (STEENBOOCK). C'est donc que les stérols végétaux possèdent également la propriété d'être activés par les radiations ultra-violettes, et la question de leurs rapports avec les vitamines a pris depuis quelques années une importance énorme au point de vue médical.

WINDAUS et BRUNKEN constatent que l'ergostérol soumis à l'action des rayons ultra-violets acquiert des propriétés antirachitiques et donne la coloration bleue de la vitamine A avec le trichlorure d'arsenic.

ROSENHEIM pense que l'oxygène intervient dans la formation du pigment bleu (action du peroxyde de

benzoyle sur le cholestérol et formation d'un corps donnant la même réaction). De même TANRET constate que, par action de l'oxygène en présence d'éosine comme sensibilisateur, l'ergostérol donne un peroxyde $C^{27}H^{42}O^3$ doué des mêmes effets sur le rachitisme que le produit irradié.

Le temps d'exposition à la radiation ultra-violette varie avec les auteurs :

STRITESKY donne six heures pour avoir l'effet maximum sur le stérol ; l'action serait proportionnelle à la surface, et arrêtée complètement par l'interposition d'un filtre de lumière.

Il émet l'hypothèse que toute température capable de fondre le corps suffit pour l'activer.

L'irradiation de l'ergostérol est complète au bout de trente minutes, sans que pour cela l'absorption ultra-violette soit terminée (FABRE et SIMONNET).

La constitution du corps soumis à l'irradiation n'est pas indifférente.

Pour HESSE et ANDERSON (17) le stérol activé serait optiquement actif, non saturé, et posséderait trois doubles liaisons et un radical hydroxyle.

HEILBRON, MORTON et SEXTON ont observé une absorption particulière par les composés possédant au moins deux doubles liaisons dans leur molécule.

D'après eux, la transformation de l'ergostérol en vitamine D est une déshydrogénation conduisant à une cétone partiellement hydrogénée.

DRUMMOND, CHANNON et COWARD, après dissolution de l'insaponifiable de l'huile de foie de morue dans l'alcool méthylique à basse température, ont obtenu

par entraînement à la vapeur d'eau un corps possédant toutes les propriétés biologiques et chimiques de la vitamine A. Ils y ont caractérisé un ou plusieurs alcools non saturés possédant un oxydrile et une fonction éthylénique.

D'après BILLS et MAC DONALD, la double liaison doit être intacte, les stérols saturés n'étant pas activables.

ROSENHEIM et WEBSTER étudiant la formation de la vitamine D remarquent que dans les divers stérols l'OH secondaire est nécessaire à l'action des radiations.

Tous les auteurs sont d'accord pour affirmer la très faible proportion de substance activable contenue dans une importante quantité de stérol, mais les opinions sont diverses lorsqu'il s'agit de préciser la nature de cette substance.

ROSENHEIM et WEBSTER n'ont pu activer les stérols purifiés par la voie du bromure. Ils croient que la vitamine dérive d'une impureté ou *provitamine* contenue seulement dans les stérols végétaux et surtout dans l'ergostérol de TANRET. Ce dernier introduit dans l'organisme par l'alimentation, constituerait la partie activable de la stérine animale.

BILLS, HONEYWELL et MAC NAIR font de l'ergostérol et d'un facteur non identifié la partie activable de la cholestérine. L'irradiation ne serait plus possible avec de vieux produits. Avec des corps fraîchement préparés elle serait la même au bout de plusieurs heures ou de quelques minutes.

HEILBRON, KAMM et MORTON évaluent la substance absorbante à 2/1000 de la masse totale.

HESSE et WINDAUS n'ont pu activer la phytostérine pure et pensent qu'elle devient activable par action d'une substance « contaminante ».

En résumé, l'esprit se trouve en présence d'une série de faits établissant une relation certaine entre les stérols et les vitamines A et D, sans qu'il puisse en tirer d'autre conclusion que celle qu'écrivait J.-C. DRUMMOND (12) : « Nous ne connaissons pas encore exactement les conditions qui sont favorables à la production de vitamines antirachitiques aux dépens de la cholestérine ou de la phytostérine et nous ne savons encore rien de la nature des transformations photochimiques qui se produisent ».

II. — Relations avec les acides biliaires

Ce n'est pas spécialement des phytostérols que nous parlerons ici, mais plutôt de leur très proche parent la cholestérine. Mais il reste bien entendu dans notre esprit que tout ce qui s'applique à celle-ci intéresse ceux-là.

WIELAND, SCHLICHTER et JACOBI, étudiant la constitution des acides choliques proposent une nouvelle formule développée du cholestérol analogue à celle de l'acide désoxybilianique. Plus récemment, CUNY (10) s'est attaché à résoudre la question des rapports entre ces deux familles de corps, et à la suite d'études dont le développement ne saurait trouver place ici, il émet les conclusions suivantes : l'acide cholanique s'obtient par oxydation du pseudo-cholestane carbure

dérivé du stérol par réduction; la réduction des acides biliaires donne le même acide qui occupe ainsi une position intermédiaire.

Certains auteurs admettent que le stérol animal dérive des stérols végétaux introduits dans l'organisme par l'alimentation. L'élimination se ferait sous forme d'acides choliques et les calculs biliaires seraient dus à une action défectueuse de la bile.

III. — Relations avec les matières grasses

C'est BURCHARD qui a montré que la stérine végétale se trouve dans la partie insaponifiable des corps gras naturels, libre, mais surtout éthérifiée par les acides gras et aromatiques. Voilà donc deux séries de corps dont la coexistence est constante, il serait intéressant de savoir si la formation des premiers, les stérols, est parallèle à celle des seconds, les corps gras, ou dérive de leur métabolisme.

LIFSCHÜTZ vient à l'appui de la seconde hypothèse en obtenant *in vitro* un corps donnant les réactions de LIEBERMANN et SALKOWSKI par oxydation permanganique à 80° de l'acide oléique dissout dans l'acide acétique.

TERROINE (37) constate chez les animaux un parallélisme entre les quantités de stérine et de corps gras.

Tout récemment, TERROINE, KOPP, BONNET et VÉCHOT (38) se sont attachés à résoudre ces questions. Nous ne donnerons que leurs conclusions : les graines riches en acides gras contiennent le moins de phy-

tostérine, tel le ricin, tandis que le sorgho, très pauvre en graisses, contient presque autant de stérols que le lin ou le colza ; pendant la germination, période où la jeune plante utilise les réserves accumulées, les graines oléagineuses perdent leurs corps gras et accroissent leur quantité d'insaponifiable et de stérols, augmentation bien plus grande à la lumière qu'à l'obscurité ; au même stade du développement, le pois et le sorgho, pauvres en graisses, montrent une diminution à peine sensible ; toutefois, chez le haricot, il y a augmentation certaine ; le stérigmatocistis nigra, cultivé sur corps gras sans distinction, élabore plus de stérol, bien qu'en quantité très variable pour une même culture, que sur glucose ou peptone.

De tout ceci, les auteurs déduisent, mais sans affirmer, une non production parallèle de graisses et de stérols, mais plutôt une formation de ces derniers aux dépens des corps gras.

IV. — Relations avec le carotène

En 1861, HUSEMAN isole de la carotte un corps cristallisé incolore qu'il appelle l'hydrocarotine. D'après lui, il accompagnerait toujours le carotène, pigment rouge de la carotte, de la tomate et du piment, hydrocarbure en $C^{26}H^{38}$ cristallisé en aiguilles rouge foncé.

ARNAUD (3), qui a beaucoup étudié ce pigment, montre que l'air et la lumière l'altèrent facilement et le décolorent en donnant un produit oxygéné facilement identifiable avec le phytostérol de HESSE et l'hydro-

carotène de HUSEMANN ; le point de fusion est légèrement différent, et la solubilité dans l'alcool un peu plus faible.

ZOPF, KOHL et HILGER (11) soutiennent également la formation de certains stérols par oxydation lente de pigments colorés. Ainsi KLOBB a remarqué que les cristaux rouges de l'*arnica* donnent à l'air et à la lumière un corps identique à l'arnidiol. Dans l'organisme, le carotène se transforme en dérivé incolore et PISSAVY et MONCEAUX (27) prétendent que la grande quantité de carotène contenue dans le sérum des tuberculeux est due à la diminution du pouvoir oxydant des tissus, cette oxydation donnant de la cholestérine.

Il semblerait ainsi y avoir production de stérols à partir des pigments colorés ; nous n'avons trouvé qu'une opinion contraire, celle de REINITZER.

V. — Relations avec les terpènes

Nous avons vu dans les réactions colorées des phytostérols que les terpènes donnent parfois des colorations identiques avec les mêmes réactifs. De là à voir une parenté entre ces deux classes de corps il n'y avait qu'un pas qui fut vite franchi.

WINDAUS et STEIN, déjà en 1905, émettent une opinion dans ce sens, confirmée par MAUTHNER.

SCHROTTER et WEITZENBOCH obtiennent avec la cholestérine le même acide rhizocholique $C^8H^6O^7$ donné par le camphre et l'essence de térébenthine.

TSCHIRCH et BRUNING (5), par un traitement approprié, retirent de la térébenthine officinale une poudre blanche amorphe, l'acide pimarique, présentant quelques réactions colorées de la cholestérine. LIBERMANN (21) reconnaît à ce dernier corps une étroite parenté avec les acides sylvique et quinovique.

Par distillation sèche du cholestérol avec la poudre de zinc, VAN DER HAAR obtient une huile terpénique volatile, FAUHL un terpène $C_{7}H_8$ et ses polymères, CLAMICIAN (8) les mêmes carbures que ceux donnés par l'acide abiétique dans les mêmes conditions.

TSCHIRCH fait des phytostérols la substance mère des résines de conifères.

STEINLE et KAHLENBERG, dont la réaction est commune aux deux séries de corps, donnent aux stérols une nouvelle formule présentant des noyaux communs avec celle des terpènes.

MONTIGNIE (24), dans un mémoire récent, expose la question ; se basant sur les faits que : la réaction avec le pentachlorure d'antimoine est donnée aussi par certains acides non saturés, que les terpènes ne donnent pas la réaction de Liebermann, que, soit par distillation, soit par action de réactifs énergiques, il est très pénible de fractionner la cholestérine et d'en obtenir des produits faciles à identifier, il écrit : « Ce n'est pas parce que dans certaines réactions on a obtenu des produits résinoïdes ou que le cholestérol possède une chaîne isopropylique et une double liaison (qui semble fournir des réactions semblables à

celles des terpènes) qu'on dira qu'il est parent avec eux. » La conclusion est que les stérols sont une famille de corps particuliers comme les sucres, les albuminoïdes, etc...

Méthodes d'extraction des phytostérols

RITHAUSEN (1867) traite le gluten et HESSE (1878) la fève de Calabar par l'éther. RITTER (1902) (30) épuise aussi les graines à l'éther dans un appareil à extraction, saponifie la graisse obtenue par l'éthylate de sodium ou la potasse alcoolique et fait cristalliser l'insaponifiable dans l'alcool à 90°.

SMID et BILOWITZKI (33) épuisent les racines de *Bar-dane* par l'alcool bouillant, filtrent et distillent l'extrait obtenu. Le résidu est lavé à l'eau puis épuisé à l'éther de pétrole après séchage dans le vide sur anhydride phosphorique. Après saponification par la potasse alcoolique à 10 %, pendant 24 heures, les stérols sont précipités par addition d'eau, séchés au bain-marie, repris par l'acétone et purifiés par cristallisation dans l'alcool. Ces auteurs ont opéré d'une façon identique sur l'*Ulmus Campestris* et les feuilles et les tiges de *Ficus carica*, mais en saponifiant directement le résidu desséché dans le vide sans l'épuiser par l'éther de pétrole.

GÉRARD (15) saponifie les matières grasses extraites des substances végétales par la soude en solution alcoolique. Après distillation, le savon résiduel broyé

avec du sable fin, puis desséché au bain-marie, est épuisé par l'éther sec.

Ces méthodes, si elles diffèrent légèrement par le mode opératoire et le choix des dissolvants, ont toutes le même but : extraire la plus grande partie des phytostérols contenus dans une prise d'essai énorme (jusqu'à 65 kgs de son de blé (ANDERSON) (1) afin d'étudier une quantité appréciable de produit.

Méthodes de dosage des phytostérols

I. — Méthodes colorimétriques

Elles utilisent les réactions colorées citées précédemment dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de substance mise en jeu : LIBERMANN, STEINLE et KAHLENBERG, COQUELET.

La première, une des plus anciennement connues, est aussi la plus utilisée. Elle sert de base au dosage de la cholestérine dans les tissus tel que le pratique GRIGAUT. MANCEAU l'a appliquée au dosage des phytostérols dans les cryptogames : il comparé en tubes gradués la coloration donnée par un certain volume (5 c. c.) d'extrait chloroformique avec celle donnée par le même volume d'une solution chloroformique titrée de cholestérine animale, en ayant soin d'ajouter dans chaque cas la même quantité d'acide sulfurique et d'anhydride acétique. Si les deux tubes ont la même teinte, les solutions ont la même concentration. Si l'un présente une coloration plus foncée, il

dilue son contenu jusqu'à égalité de teinte avec du chloroforme et de l'anhydride acétique dans la proportion suivante :

Chloroforme 5 c. c.

Anhydride acétique 2 c. c

Par un rapide calcul, il détermine la quantité de cholestérine à doser.

Cette méthode si simple offre l'inconvénient :

De comparer la coloration vert jaunâtre donnée par les phytostérols à la coloration vert émeraude donnée par la cholestérine animale. A intensité égale, il est difficile à l'œil d'apprécier l'égalité de ces deux teintes. D'autre part, si les stérols donnent la teinte maxima en quelques secondes, la cholestérine animale exige trente minutes, d'où complications.

Toutefois, si la valeur absolue des dosages ne peut être certifiée (l'erreur serait de 4 à 5 % d'après BLOOR), leur valeur relative est très précise. C'est ce qui importe le plus.

STEINLE et KAHLENBERG (34), dans un mémoire volumineux, étudient la réaction qui porte leur nom et prétendent qu'elle peut servir pour un dosage colorimétrique. Ils indiquent le mode opératoire assez compliqué, mais nos essais pour l'appliquer sont restés sans résultat satisfaisant. Cet échec est sans doute imputable à une purification imparfaite des stérols.

Nous avons vu en effet que beaucoup d'autres corps donnent la même coloration avec le réactif au pentachlorure. La réaction de LIBERMANN est supérieure à

ce point de vue, les impuretés résiduelles n'ayant pas d'influence sur le dosage.

Enfin, récemment, COQUELET (1927) a découvert la réaction au furfurol et acide sulfurique et l'applique au dosage de la cholestérine animale. Là encore, les résultats de nos essais pour doser les stérols végétaux par le même procédé ne sont pas à retenir. La coloration très intense nécessite pour une lecture facile des dilutions très grandes qui compliquent beaucoup les opérations.

Nous citerons pour mémoire la méthode de SURANYI et KORENYI (35) qui ne peut être mise dans aucun des groupes de dosage, mais se rapproche beaucoup des colorimétriques par son mode opératoire.

On mélange des quantités égales (0 c. c. 1) de solutions de cholestérine à des concentrations différentes dans l'alcool à 96° et d'eau distillée. Il se produit un précipité. On note la quantité de solution de cholestérine qu'il faut ajouter au mélange pour redissoudre le précipité. Cette quantité sera toujours la même pour une certaine concentration.

Les auteurs ont eu l'idée de comparer par ce moyen une solution de concentration inconnue avec des solutions titrées. Cette méthode séduisante par son principe et sa simplicité, n'est pas applicable avec des solutions de pureté imparfaite. Tous les corps autres que les stérols précipiteront plus tôt ou plus tard qu'eux entraînant ainsi des erreurs notables.

II. — Méthodes gravimétriques

Si l'on veut extraire les phytostérols pour les peser, on saponifie le magma cristallin provenant de l'extractif par une solution alcoolique de soude ou de potasse, puis on lave à l'alcool et à l'eau. Les stérols se précipitent, on les purifie par cristallisations successives dans l'alcool. On dessèche finalement dans le vide sur P_2O_5 et pèse. Cette méthode n'est applicable que lorsqu'on opère sur d'énormes échantillons. Mais en général, la prise d'essai est trop faible et les stérols en trop infime proportion pour être ainsi pesés directement. C'est alors qu'intervient la méthode de WINDAUS, la plus précise.

PASCUCCI (39) remarque, en 1905, l'affinité chimique de la cholestérine pour les saponines. Ses éthers ne réagissent pas (HAUSSMANN), (ABDERHALDEN), (LE COUNT). La digitonine (1), saponine de la digitale, dont la formule est assez bien établie et qui se présente cristallisée, donne avec la stérine une combinaison cristallisée à peu près insoluble dans l'alcool. Ce complexe ou digitonide consiste en une molécule de digitonine et une molécule de cholestérine et pèse envi-

(1) *Digitonine* : Glucoside de la série des saponines isolé du *Digitalis purpurea* par Schmiedeberg en 1874. Appelé par KILIANI digitonine, et par HOUDAS digitaline. Donne par hydrolyse du dextrose, du galactose et de la digitogénine. Soluble dans l'eau, l'éther, le chloroforme, peu soluble dans l'alcool. Se décompose au-dessus de 235° .

ron quatre fois le poids de cholestérine combinée.

La réaction s'écrit :



Stérol Saponine complexe

La lumière ultra-violette favorise la combinaison. WINDAUS, en 1910, s'en sert pour doser la cholestérine dans le sang. LAUDAT, LEMELAND et CAMINADE étudient la réaction. Le précipité cristallise en aiguilles fines en rosace. Il est soluble dans la pyridine, l'acide acétique glacial, l'alcool méthylique, l'alcool absolu bouillant ; très légèrement soluble dans l'éther ; insoluble dans le chloroforme, l'eau, l'acétone, la benzine, le toluène, l'acétate d'éthyle. Dans l'alcool à 95° la solubilité est extrêmement faible et augmente avec la température. Ce complexe contient de l'eau de cristallisation qui s'en va à 110° ; il est très hygroscopique et difficile à comburer à l'analyse.

En liqueur aqueuse, les alcools amylique et caprylique, les phénols et les triphénols donnent des précipités avec la même saponine.

WINDAUS (40) dissout la matière à étudier dans une quantité cinquante fois plus grande d'alcool à 95° bouillant, et ajoute jusqu'à cessation de précipité une solution de digitonine à 1 % dans l'alcool à 90 % chaud. Il laisse reposer le mélange plusieurs heures et après filtration au creuset de GOOCH, le précipité est lavé à l'alcool, puis à l'éther, séché à 100° et pesé. Le poids obtenu multiplié par 0,2431 (0,25 pour arrondir les chiffres) donne la quantité exacte de cholestérine. Cette réaction est très sensible puisque un

dixième de milligramme de stérol donne encore un léger trouble.

C'est HAUSMANN qui découvrit que les phytostérols agissaient comme la cholestérine animale. WINDAUS (39) est convaincu qu'ils donnent la même combinaison dans les mêmes conditions ; les complexes formés ne différaient entre eux que par les formes cristallines, l'eau de cristallisation et les différences de solubilité. Le même auteur en fait des individualités chimiques d'adsorption.

PENAU et Mlle HARDY (26), étudiant le complexe donné par l'ergostérol, remarquent qu'un excès de digitonine est nécessaire pour que le précipité soit complet et rapide. A 80° il doit présenter l'état cristallin et à 15° l'état amorphe, mais son poids est le même.

Aux basses températures, le précipité ne se forme pas du tout ou très lentement ; sa formation n'est complète qu'au bout de dix-huit heures et l'alcool la retarde au début.

L'eau est nécessaire à la formation du complexe hydraté, WINDAUS n'a pas fait cette remarque parce qu'il opère avec des solutions dans l'alcool à 95°, tandis que les auteurs emploient l'alcool à 99°. Ils recommandent enfin d'opérer le dosage à froid, on évite ainsi l'évaporation du solvant et la formation d'une collerette semi cristallisée difficile à détacher du verre.

La critique faite à la technique de WINDAUS est son manque de précision absolue par suite de la solubilité

plus ou moins grande du complexe dans les liquides de lavage, mais les opinions ne sont pas unanimes sur la valeur de l'erreur.

HOWARD MUELLER lave à l'éther puis à l'eau bouillante et compte une erreur de 3 % sur 1 centigr. de stérine.

H. DAM remarque que le complexe varie de composition avec l'excès de digitonine ajouté. Pour éviter que l'alcool n'entraîne par dissolution une quantité appréciable du précipité, il le sature au préalable avec le même précipité. Cette méthode lui semble meilleure que la colorimétrie.

J. A. GARDNER et M. WILLIAMS ont établi les solubilités des différents digitonides dans les solvants usuels à la température ordinaire et conseillent de corriger les résultats par rapport au volume du liquide employé pour le lavage. Or, dans les tableaux qu'ils donnent, on remarque que les phytostérols donnent des complexes insolubles dans l'alcool à 95° et l'éther à la température du laboratoire.

MATHEWS ALBERT ajoute 16 milligr. au poids du complexe par 10 c. c. de solution de cholestérine pour compenser la perte par lavage, lorsqu'il dose ce corps dans les tissus.

La digitonine étant un produit assez rare et très coûteux, PENAUD et Mlle HARDY la récupèrent en faisant bouillir longuement le complexe dans le toluène qui dissout le stérol, dans un courant d'azote.

SURENYI remplace le toluène par le xylol à l'air pendant dix heures. WINDAUS emploie l'anhydride acétique et sépare l'acétate de stérine par l'éther.

Origine botanique et rôle des phytostérols

Nous avons signalé (Introduction) la présence constante des phytostérols dans toutes les cellules végétales. L'exposé complet des travaux ayant trait à leur recherche se complique de la multiplicité des observations et déborde le cadre de cet article. KLOBB (18) et CZAPEK (11) ont publié la liste de toutes les plantes étudiées.

Toutefois nous ne pouvons passer sous silence la belle série de recherches de TANRET et GÉRARD sur les cryptogames, celles d'ANDERSON et MOORE, d'ANDERSON et NABENHAUER sur les céréales, de SCHULZE et BARBIERI, de JACOBSON, de BÖMER et WINTER, de RITTER, de WINDAUS et HAUTH.

Dans la plante les phytostérols sont en général libres (toujours chez les cryptogames) (29) et plus abondants dans les fleurs et les graines que dans les autres organes.

ANDRÉ (2) et LINDENMEYER signalent une augmentation de la teneur en phytostérols des graines de pois pendant la maturation. SCHULZE et BARBIERI (32) constatent que l'augmentation est de 40 à 46 % pendant la germination des graines de lupin, de blé et de ray-gras à l'obscurité.

MANCEAU (22) cultivant le *Penicillium glaucum* sur liquide type de RAULIN suit pas à pas la synthèse des phytostérols et des lécithines à l'aide d'éléments aussi simples que l'acide tartrique et le saccharose. Il montre que la proportion des phytostérols et des lécithi-

thines croît avec l'ancienneté des cultures. Malheureusement de ces remarques on n'a pu, jusqu'à présent, tirer aucune conclusion satisfaisante quant au rôle des phytostéroïdes dans la plante. Pour HOPPESEYLER ils doivent être considérés « comme un des produits de dédoublement résultant du processus habituel de la vie cellulaire ».

DEUXIÈME PARTIE

Premiers travaux

M. le Professeur BRETIN a bien voulu nous proposer l'étude des variations des quantités de phytostérols contenues dans les organes (racines, tiges, feuilles, fleurs et graines) du *blé*, de la *pomme de terre* et du *pois* cultivés à la lumière et à l'obscurité, en pleine terre et dans le liquide de SACHS de composition suivante :

Eau	1.000 gr.
Nitrate de potasse	1 gr.
Sulfate de magnésium	0 gr. 50
Sulfate de calcium?...	0 gr. 50
Phosphate de calcium	0 gr. 50
Chlorure de sodium	0 gr. 50
Sulfate de fer	0 gr. 10

I. — OBTENTION DES CULTURES. RÉCOLTE ET PRÉPARATION
DES ÉCHANTILLONS

Sur les conseils de M. le Professeur MANCEAU nous avons ajouté au liquide nutritif des traces de sulfate de manganèse, sel d'un métal dont la présence est constante dans les cendres des végétaux. Gabriel BERTRAND en fait un « *excitateur d'oxygène* ».

Afin d'obtenir les échantillons abondants rendus nécessaires par la faible teneur en phytostérois des organes végétaux, nous avons délaissé la culture au laboratoire et pratiqué l'ensemencement dans un terrain argilo-calcaire. De grandes caisses en bois remplies de la même terre et également ensencées ont été transportées à l'obscurité.

Les cultures en solution aqueuse ont demandé plus de soins.

Les graines et tubercules ont été déposés sur du coton hydrophile très divisé et étalé sur des clayonnages en bois assemblés sans clous. Chaque clayonnage fut ensuite introduit dans un vase lavé au bichromate sulfurique, rincé soigneusement et rempli de liquide nutritif dilué au 10^e avec une disposition permettant le mouillage automatique du coton. Il faut renouveler ce liquide assez fréquemment en augmentant la concentration de façon à atteindre celle donnée par la formule ; car, à l'époque de la floraison la plante réclame une plus grande quantité d'aliments. La moitié de ces récipients fut transportée à l'obscurité.

La récolte des différents organes a été faite très

aisément, sauf pour les fleurs de blé de faibles dimensions et de durée éphémère. Il faut noter la très faible production de fleurs et de fruits sur liquide de SACHS.

Les échantillons lavés et divisés par passages successifs au hache-viande ont été desséchés à l'étude à 120° pendant quarante-huit heures.

II. — EXTRACTION DES PHYTOSTÉROLS

Nous avons adopté la méthode de MANCEAU (22) en y apportant certaines modifications dont l'opportunité n'est par apparue à l'examen des résultats.

Technique : Dans un appareil de KUMAGAWA et SUTO, épuiser pendant huit heures la substance par l'alcool absolu (1). Nous ne décrivons pas cet appareil bien supérieur à tous les autres (SOXHLET, ZULKOWSKI). Il présente sur eux l'avantage d'opérer l'épuisement à une température voisine de l'ébullition et donne des résultats plus élevés comme l'ont constaté BLONDET-DESBORDES, MANCEAU et MORIN. Employer des appareils grands (250 c. c.) et nombreux. Un courant d'air unique suffit pour plusieurs réfrigérants et comme la surveillance d'une batterie n'est pas plus pénible que celle d'une unité, on réalise ainsi un gain de temps énorme.

Pour obtenir un fonctionnement parfait du siphon la cartouche de cellulose ne doit pas adhérer aux parois ou au fond. La poudre végétale doit être tassée très légèrement dans la cartouche que l'on ferme par

(1) En fait, même au bout de six heures, on ne trouve plus de stérols dans le liquide d'épuisement contenu dans le siphon.

un tampon de coton de verre qui ne doit pas dépasser les bords de la douille.

Remplir aux deux tiers le ballon avec de l'alcool absolu et, après addition de quelques billes de verre pour éviter toute surchauffe, mettre l'appareil en marche (1).

III. — TRAITEMENT DE L'EXTRAIT ALCOOLIQUE

A la fin de l'épuisement le liquide d'extraction possède une coloration jaune si la plante s'est développée à l'obscurité, verte si la croissance a eu lieu à la lumière. Ce liquide souillé par de la chlorophylle, des pigments jaunes, des graisses et souvent des alcools à poids moléculaire élevé provenant des cires, est impropre à tout dosage. Il convient de le débarrasser de ces impuretés. Voici la méthode que nous avons employée :

Ajouter au liquide jusqu'à réaction alcaline de la soude alcoolique faite suivant la formule (25) :

Sodium 8 gr.

Alcool à 95° 160 c. c.

Chauffer doucement au bain-marie en agitant jusqu'à évaporation presque complète de l'alcool. Après reprise du résidu par l'eau, on obtient une solution contenant : 1° les phytostérols libérés de leurs éthers en suspension ; 2° les impuretés, notamment la chlorophylle, en grande partie désagrégées et solubilisées.

Dans une ampoule à robinet, la solution est lavée

(1) Si la matière est légère, recharger la cartouche sans changer le liquide d'extraction.

avec du chloroforme jusqu'à ce que la réaction de LIEBERMANN soit négative.

Quelquefois, il se produit une émulsion très lente à se détruire. Dans ce cas GÉRARD conseille de décomposer les savons par une solution de chlorure de calcium. Il se produit un précipité de sels de chaux d'acides gras. La liqueur surnageante et le précipité sont épuisés séparément. Les liquides d'épuisement sont réunis et additionnés de chloroforme jusqu'à obtention d'un volume de 100 c. c. Cette solution est souvent teintée en jaune verdâtre par des impuretés résiduelles.

IV. — DOSAGE DES PHYTOSTÉROLS

Nous avons adopté une méthode basée sur la réaction de LIEBERMANN en nous inspirant des remarques énoncées au chapitre des réactions colorées.

Prendre comme liqueurs étalons des solutions fraîches (1) d'ergostérol avec des concentrations allant de 0 gr. 25 à 0 gr. 0005 pour 100 c. c. de chloroforme. Ce stérol ne présente aucun des inconvénients du produit animal : différence de teinte et retard dans son apparition. Une difficulté particulière se manifeste par suite de la teinte parasite des liqueurs à titrer. Pour avoir des couleurs comparables, derrière chaque tube étalon nous plaçons un autre tube contenant 5 c. c. de la solution chloroformique à titrer et 2 c. c.

(1) Une solution ancienne d'ergostérol jaunit et le dosage colorimétrique témoigne d'une quantité de stérol inférieure au titre réel.

d'anhydride acétique, donc ne présentant que la teinte parasite.

Dans chaque tube gradué (les choisir du même diamètre) on verse successivement 5 c. c. de liqueur chloroformique à doser ou titrée, 2 c. c. d'anhydride acétique, III gouttes d'acide sulfurique et on mélange. Il est indispensable de bien respecter ces proportions pour l'exactitude des dosages. La comparaison des teintes se fait plus facilement en utilisant un comparateur placé devant une source de lumière intense avec verre dépoli.

V. — DISCUSSION DES RÉSULTATS. CAUSES D'ERREUR.

Malheureusement l'examen des résultats ne nous permet d'en tirer aucune conclusion satisfaisante. Souvent les chiffres trouvés étaient en désaccord avec les faits déjà vérifiés. Entre autres anomalies, comment expliquer l'absence totale de phytostérine dans les téguments de la graine de pois alors que la richesse des enveloppes est la règle. De même les feuilles et les tiges de blé auraient été plus riches que les graines.

L'impossibilité où nous étions de vérifier ces résultats nous a mis dans l'obligation de douter de tous les autres obtenus dans les mêmes conditions. Toutefois nos recherches n'ont pas été vaines puisqu'elles nous ont permis de relever dans nos méthodes opératoires quelques causes d'erreurs :

1° Pulvérisation imparfaite au hache-viande, surtout pour les feuilles, tiges et racines, d'où mauvaise action du dissolvant sur les stérols.

2° Le dépôt produit par le refroidissement du ballon pendant le rechargement nécessité par la légèreté de certains échantillons ne se redissout pas toujours entièrement, d'où élévation de température sur certains points.

3° L'addition de chlorure de calcium pour détruire les émulsions rend de grands services, mais nous ne sommes pas certains d'avoir complètement épuisé le savon calcaire très dense.

4° Etalons trop nombreux d'où nécessité de faire très rapidement les comparaisons, car la teinte verte se détruit au bout de peu de temps.

5° La teinte jaune verdâtre des solutions à titrer superposée dans le comparateur à celle de l'étalon, l'accroît et diminue en retour le titre trouvé. Il est préférable de purifier les phytostéroïls par cristallisations successives dans l'éther.

TROISIÈME PARTIE

Nouveaux travaux

A la suite de cet échec, la saison n'étant plus favorable à de nouvelles cultures, M. le Professeur BRETIN voulut bien nous confier l'étude des quantités relatives de phytostérols contenues dans les téguments et l'amande, dans la partie interne et la partie corticale de différents fruits, tubercules, bulbes et graines.

I. — PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Nous avons séparé soigneusement les enveloppes de la partie interne. Après passage à l'étuve à 80° jusqu'à poids constants, les différents échantillons ont été broyés au hache-viande, pulvérisés finement au mortier et tamisés.

II. — EXTRACTION ET DOSAGE DES PHYTOSTÉROLS

La poudre très fine ainsi obtenue a été épuisée dans l'appareil de KUMAGAWA et SUTO par l'alcool absolu

pendant six heures. La densité des substances traitées et la grandeur des appareils nous ont permis d'éviter le rechargement de ces derniers.

Nous avons effectué le dosage des stérols en employant dans l'ensemble la méthode appliquée par MANCEAU au *Penicillium Glaucum*.

Technique : Dans une ampoule à robinet, mesurer un volume du liquide d'extraction tel qu'il corresponde à 2 gr. de substance.

Ajouter partie égale d'une solution au 50° de soude dans l'eau distillée. Mélanger et ajouter à ce mélange partie égale d'éther éthylique. Mélanger de nouveau. Agiter pendant dix minutes et laisser reposer. Sou-tirer la couche aqueuse inférieure. La remplacer par quelques centimètres cubes d'eau distillée que l'on fait couler le long des parois. Après cinq minutes de repos procéder à un nouveau lavage. L'éther séparé est alors versé dans une petite capsule de porcelaine et évaporé au bain-marie. Le résidu de l'évaporation renferme la totalité des phytostéroïls contenus dans la prise d'essai.

D'autre part, préparer une solution étalon renfermant 0 gr. 05 d'ergostérol pour 100 c. c. de chloroforme. Préparer six tubes dans lesquels on verse respectivement 0 c. c. 3, 0 c. c. 5, 1 c. c., 1 c. c. 5, 2 c. c., 2 c. c. 5 de cette solution; compléter à 5 c. c. avec du chloroforme.

Dissoudre le résidu provenant de la solution éthérée des phytostérols dans 5 c. c. de chloroforme. Les

verser dans un tube de même diamètre (1) que ceux contenant les étalons et y ajouter 2 c. c. d'anhydride acétique et trois gouttes d'acide sulfurique. *La coloration verte se produit avec son maximum d'intensité au bout de cinq à quinze minutes suivant les échantillons.* Il convient donc de ne verser les 2 c. c. d'anhydride acétique et les trois gouttes d'acide sulfurique dans les tubes étalons qu'au moment où la solution à titrer est à la teinte maxima. *En effet l'ergostérol donne le maximum d'intensité de la teinte verte au bout de quelques secondes.*

Quatre cas peuvent se présenter : la solution à titrer présente la même teinte que celle d'un des tubes étalons, ou une teinte intermédiaire entre celles de deux de ces tubes, ou inférieure ou supérieure à celles des deux tubes extrêmes. Par dilution soit de la solution à titrer, soit d'une des solutions étalons, il est toujours possible d'amener la première à égalité de teinte avec une solution de titre connu. Toutefois nous n'avons pu apprécier une différence de teinte plus faible que celle donnée par le même volume de deux solutions contenant des quantités de phytostérols différentes de 0 gr. 00005. C'est pourquoi il importe de faire chaque dosage en double et de prendre comme teneur en phytostérols la moyenne des deux chiffres. Chaque centimètre cube de la solution étalon contient 0 gr. 0005 d'ergostérol. Si x est le nombre de centimètres cubes de cette solution contenus dans le

(1) Nous avons employé pour ces dosages les tubes gradués dits « de Grigaut ».

tube dont la teinte correspond à celle de la solution à titre, y la dilution de cette solution, la quantité de phytostérols contenue dans 1.000 gr. de substance sèche sera donnée par la formule :

$$0 \text{ gr. } 0005 \times x \times y \times 500 = 0 \text{ gr. } 25 \times x \times y$$

III. — VÉRIFICATION DES RÉSULTATS

Dans ce but nous avons employé la méthode pondérale.

Technique : 1° Tout d'abord opérer comme il est dit dans l'exposé de la méthode colorimétrique sur un volume d'extractif alcoolique correspondant à 10 gr de substance, volume ramené à 10 c. c. au bain-marie. Employer pour la saponification une solution de soude à 10 %.

2° Evaporer au bain-marie la solution chloroformique contenant la totalité des phytostérols contenus dans la prise d'essai. Dissoudre le résidu dans 50 c. c. d'alcool à 95° bouillant et filtrer. Ajouter une solution chaude de digitonine à 1 % dans l'alcool à 90° en quantité telle que le poids de digitonine mis en réaction soit supérieur à trois fois le poids des stérols déterminés approximativement par la méthode colorimétrique.

Mélanger soigneusement avec un agitateur qu'on lave ensuite avec 1 c. c. d'alcool à 95°. Laisser la réaction se faire pendant douze heures. Au bout de ce temps, passer sur filtre taré en papier et laver à l'alcool à 95°, puis à l'éther. Sécher une heure à l'é-

tuve à 105° et peser. Le poids obtenu ne doit pas être corrigé, le complexe n'étant soluble dans aucun de ces dissolvants à la température du laboratoire.

En multipliant par 0,2431 le chiffre obtenu on a la quantité de stérols contenus dans la prise d'essai.

Vérifier dans le filtrat alcoolique l'absence de stérols par addition de la solution de digitonine. En cas de précipitation, opérer comme il est indiqué précédemment et totaliser les deux résultats.

Nous avons vérifié plusieurs de nos résultats. Les quantités trouvées se sont montrées supérieures de 2,5 % dans le son de *riz* et de 8 % dans la pulpe de *vesces*.

Les dosages effectués par la réaction de LIEBERMANN témoignent donc d'une quantité de phytostérols inférieure à celle donnée par la précipitation à la digitonine. Nous nous proposons, dans un travail ultérieur, de voir si cette différence est due à des stérols à composition particulière, qui ne donneraient pas la réaction de LIEBERMANN. A la vérité, il nous est permis d'affirmer que 90 à 95 % des stérols recherchés donnent cette réaction. Pour étudier les variations de ces corps, cette méthode colorimétrique est donc suffisante ; elle a l'avantage d'être non seulement rapide, mais encore économique.

Quoiqu'il en soit, il serait intéressant d'essayer de séparer les différents stérols et d'en étudier minutieusement la composition,

Teneurs en phytostérols des enveloppes et de l'intérieur des fruits, graines, tubercules et bulbes étudiés⁽¹⁾

(Valeurs exprimées en grs par 1.000 grs de substance sèche)

	Enveloppes des graines ou fruits			Intérieur des graines ou fruits		
<i>Graminées :</i>						
Avoine	(0.675)	0.625	(0.575)	(0.264)	0.252	(0.240)
Orge	(0.650)	0.600	(0.550)	(0.365)	0.340	(0.315)
Mais	(0.669)	0.632	(0.595)	(0.675)	0.625	(0.575)
Riz	(0.575)	0.550	(0.525)	(0.125)	0.125	(0.125)
Millet	(0.670)	0.620	(0.570)	(0.590)	0.540	(0.490)
Alpiste	(0.700)	0.675	(0.650)	(0.255)	0.230	(0.205)
Sorgho	(0.660)	0.635	(0.610)	(0.825)	0.750	(0.675)
<i>Légumineuses :</i>						
Haricots	(0.400)	0.375	(0.350)	(0.362)	0.350	(0.338)
Pois	(0.565)	0.540	(0.515)	(0.550)	0.525	(0.500)
Lentilles	(0.200)	0.200	(0.200)	(0.180)	0.180	(0.180)
Caroubier	(0.175)	0.175	(0.175)	(0.575)	0.525	(0.475)
Soja	(0.725)	0.675	(0.625)	(0.445)	0.420	(0.395)
Fèves	(0.513)	0.475	(0.437)	(0.457)	0.420	(0.383)
Pois chiches	(0.750)	0.700	(0.650)	(0.350)	0.350	(0.350)
Vescs	(0.572)	0.510	(0.448)	(0.150)	0.150	(0.150)
<i>Rosacées :</i>						
Amandes douces ...	(0.325)	0.300	(0.275)	(0.175)	0.175	(0.175)
Amandes amères ...	(0.550)	0.500	(0.450)	(0.175)	0.175	(0.175)
<i>Urticacées :</i>						
Chênevis	(4.675)	4.550	(4.425)	(5.800)	5.675	(5.550)
<i>Chénopodiacées :</i>						
Epinard	(0.587)	0.550	(0.513)	(0.737)	0.675	(0.613)
<i>Cucurbitacées :</i>						
Potiron	(0.525)	0.500	(0.475)	(2.720)	2.620	(2.520)
<i>Castanéacées :</i>						
Glands	(0.795)	0.745	(0.695)	(0.200)	0.200	(0.200)
Châtaignes	(0.612)	0.575	(0.538)	(0.207)	0.195	(0.183)
<i>Polygonacées :</i>						
Sarrazin	(0.620)	0.550	(0.480)	(0.352)	0.340	(0.328)
<i>Musacées :</i>						
Bananes	(0.950)	0.900	(0.850)	(0.525)	0.500	(0.475)
<i>Composées :</i>						
Tournesol	(0.312)	0.300	(0.288)	(2.175)	2.100	(2.025)

(1) Les chiffres entre parenthèses indiquent les résultats obtenus dans deux dosages comparatifs dont nous avons pris la moyenne. Parfois les deux résultats sont identiques.

	Envelop. des tubercules ou bulbes			Intérieur des tubercules ou bulbes		
<i>Solanacées :</i>						
Pommes de terre...	(0.900)	0.875	(0.850)	(0.350)	0.325	(0.300)
<i>Composées :</i>						
Topinambour	(0.625)	0.600	(0.575)	(0.430)	0.405	(0.380)
<i>Liliacées :</i>						
Ail	(0.312)	0.300	(0.288)	(0.225)	0.225	(0.225)
Oignon	(1.037)	1.000	(0.963)	(0.759)	0.700	(0.650)

Conclusions

Nous pouvons conclure des résultats précédents que d'une façon générale :

I. — *a)* Dans les graines des *Graminées* étudiées les téguments ont une teneur en phytostérols supérieure à celle de l'amande. Le *sorgho* seul fait exception.

b) Dans les graines de *Légumineuses* étudiées, on peut observer la même proportion à l'exception du *caroubier*.

c) Les quelques exemples pris parmi les *Rosacées*, les *Castanéacées*, les *Polygonacées*, les *Musacées* étudiées présentent la même particularité.

II. — Dans les tubercules des *solanacées* et des *composées*, que nous avons étudiés ainsi que dans les bulbes d'*ail* et d'*oignon*, nous avons observé la même répartition des phytostérols.

III. — La proportion est inversée pour les graines à huile : *chenevis*, *potiron*, *tournesol*, les amandes de ces graines contenant plus de phytostérols que leurs téguments à l'exception des *Rosacées* étudiées.

Il en est de même dans les graines d'*épinard*. Les quantités de phytostérols pour cent grammes d'amandes sèches sont en général beaucoup plus élevées que dans tous les autres bulbes, tubercules, graines ou fruits.

IV. — Les quantités de phytostérols trouvées dans les amandes et les téguments des graines de *sorgho*, *caroubier* et *épinard*, ainsi que la faible différence entre les teneurs des deux parties de ces graines permettent de les ranger très près des autres graines de *Légumineuses* et *Graminées*.

Vu :
LE DOYEN,
JEAN LEPINE.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
LEULIER.

Vu et permis d'imprimer

LYON, le 26 Juin 1934.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
JOSEPH GHEUSI.

Bibliographie

- (1) ANDERSON (R. J.) et NABENHAUER (F. P.). — The phytosterols of wheat endosperm. *Journal american Chem. Soc.*, 46, 1924.
- (2) ANDRÉ. — *Précis de Chimie végétale*. Baillière, 1924.
- (3) ARNAUD. — *C. R.*, 1886, 102. Relations des stérols avec le carotène.
- (4) BERTHELOT. — *Ann. Chim. Physiq.*, 56-51, 1856.
- (5) BRETIN et PLANCHON. — *Précis de Matière médicale*, 1928.
- (6) CHEVALIER. — Les vitamines et la pratique de l'alimentation. *Bulletin des Sciences pharmacologiques*, 1923, n° 3.
- (7) CHEVREUL. — *Ann. de Physiq. et de Chim.*, t. XCV, p. 7.
- (8) CLAMICIAN. — Cité par KLOBB (18).
- (9) COQUELET. — *C. R. de la Société de Biologie*, 1927, t. XVII, p. 749.
- (10) CUNY. — Constitution moléculaire du cholestérol et la chimie des acides biliaires. *J. Pharm. et Chim.*, t. VIII, n°s I et II, 1928.
- (11) CZAPEC. — Origine botanique des phytostérols. *Biochemie der Pflanzen*, t. I.
- (12) DRUMMOND. — Les points de vue récents sur les vitamines. *J. Pharm. et Chim.*, 8, série 14.
- (13) FABRE et SIMONET. — Les rapports des stérols avec la vitamine antirachitique. *J. Pharm. et Chim.*, n° 11, 1928.
- (14) GÉRARD. — Contribution à l'étude de la cholestérine animale et végétale. *Thèse*, Toulouse, 1895.
- (15) — Sur les cholestérines des végétaux inférieurs. *C. R.*, 1898, 126, 909.

- (16) GERARHT. — *Précis de chimie organique*, t. II, p. 425.
- (17) HESSE et ANDERSON. — Activation des fractions de stérols par irradiation ultra-violette. *J. Biol. Chem.*, t. LXXIV, 1927.
- (18) KLOBB. — Les alcools cholestériques d'origine végétale ou phytostérols. *Bulletin des Sciences Pharmacologiques*, 1910, n^{os} 3, 4, 5.
- (19) LEWKOWITSCH (J.). — *Huiles, graisses et cires*. Edition française par Bontoux.
- (20) LEULIER. — Notes sur les stérols animaux et végétaux. *Arch. de Méd. et Pharm. milit.*, juillet 1930.
- (21) LIEBERMANN. — Relations des terpènes avec la cholestérine, dans *Berichte*, 1885, 18.
- (22) MANCEAU (P.). — Contribution à l'étude des phytostérols et lécithines végétales. *Thèse d'Agrégation*, 1926.
- (23) MEESSEMAEKER. — Nouvelles réactions colorées de l'ergostérol. *C. R.*, 1930, 190, 217.
- (24) MONTIGNIE. — Le cholestérol et ses relations avec les terpènes. *Bull. Soc. Chim. de France*, janvier 1929.
- (25) MOREL. — *Précis de technique chimique*. Collection Testut.
- (26) PENAU et HARDY. — Etude du complexe digitonine-ergostérol. *Bull. Soc. Ch. Biol.*, 1929, XI, 437, avril.
- (27) PISSAVY et MONCEAUX. — *C. R. Soc. Biologie*, 15 oct. 1927.
- (28) RANDOUIN et SIMONNET. — Essai de définition des vitamines. *Bull. Soc. Ch. Biol.*, 1929, 7, n^o 9.
- (29) REVOL. — Les phytostérols en particulier des graminées et des champignons. Lyon, 1931, *Travail de thèse*.
- (30) RITTER. — Méthode d'extraction des phytostérols. *Zeit. für Physiol. Chemie*, 34, p. 461, 1902.
- (31) ROSENHEIM. — Sur quelques réactions colorées des stérols dans leur rapport avec la vitamine A. *Bioch. Journ.*, t. XXI, 1927.
- (32) SCHULZE et BARBIERI. — Les alcools cholestériques d'origine végétale. *Zeit. Phys. Chem.*, 1890, 14.
- (33) SCHMID et BILOWITZKI. — Etude sur les stérols végétaux.

- (34) STEINLE et KAHLENBERG. — Nouvelle méthode d'identification et de dosage du cholestérol et de certains autres composés. *The Journal of Biol. Chemis.*, 1926, 67, p. 425.
- (35) SURANYI et KORENYI. — Méthode simple pour la détermination quantitative de la cholestérine. *Bioch. Zeit.*, t. CLX, 1925.
- (36) TANRET. — Sur un nouveau principe immédiat de l'ergot de seigle : l'ergostérine. *Ann. Ch. et Phys.* (6), t. XX, p. 289-296, 1890.
- Sur l'ergostérine et la fongistérine. *Ann. Ch. et Ph.*, t. XV, 1908, p. 363.
- (37) TERROINE. — Contribution à la connaissance et à la physiologie des substances grasses, d'après *Bull. Soc. Ch. Biol.*, IX, 1927, p. 691.
- (38) TERROINE, BONNET, KOPP et VECHOT. — La formation des stérols est-elle liée au métabolisme des matières grasses). *Bull. Soc. Ch. Biol.*, IX, 1927, 678.
- (39) WINDAUS. — Au sujet de la séparation de la cholestérine par les saponines. *Bericht*, n° 1, p. 238, Berlin, 1909.
- (40) — . Dosage de la cholestérine par les saponines. *Annales de Merck.*, 7, 8, 10 et 11, Darmstadt.
- (41) WHITBY. — Some new reactions for the detection of sterols. *Bioch. J.*, 1923, 17, 5.
-

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS.	9
INTRODUCTION.	11
Division de notre travail	14
<i>Première partie.</i>	15
1° Propriétés physiques des Phytostérols	15
2° Propriétés chimiques des Phytostérols	16
3° Classification des Phytostérols	19
4° Réactions colorées	21
5° Relations avec les autres principes immédiats... .	33
6° Extraction des Phytostérols	43
7° Méthodes de dosage des Phytostérols	45
I. Méthodes colorimétriques	45
II. Méthodes gradimétriques	48
8° Origine botanique et rôle des Phytostérols	52
<i>Deuxième partie</i>	55
<i>Troisième partie</i>	63
CONCLUSIONS.	71
BIBLIOGRAPHIE.	73



IMP. BOSC FRÈRES & RIOU
42, QUAI GAILLETON
LYON



